Exponential phase および Plateau phase におけるヒト腎癌由来 培養細胞 KN-41の核 DNA 量と抗癌剤感受性に関する研究

金沢大学医学部泌尿器科学教室 西 野 昭 夫
(主任: 久住治男教授)

STUDIES OF CYTOFLUOROMETRIC DNA DETERMINATION AND CHEMOSENSITIVITY OF KN-41 RENAL CANCER CELLS IN EXPONENTIAL AND PLATEAU PHASES

Akio Nishino

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director: Prof. H. Hisazumi)

A KN-41 cell line established from a human renal cell carcinoma was used for this study. The KN-41 cells cultivated in exponential and plateau phases were studied in terms of DNA histogram and chemosensitivity to 8 anticancer drugs, using static cytofluorometry and a colony formation method, respectively. DNA analysis was also performed in KN-41 cell tumors heterotransplanted in nude mice and in surgical specimens from 18 renal cancer patients. The percentages of cells in $G_{1/0}$ fraction and of S fraction in the plateau phase cultures were more similar to those of the cells from the KN-41 cell tumors and surgical specimens than those in the exponential phase cultures. Two hour-exposure time was used for bleomycin (BLM), adriamycin (ADM), carbazilquinone (CQ), mitomycin C (MMC), cis-platinum (CDDP) and ACNU, and 24 hour-exposure time for vinblastin (VBL) and 5-fluorouracil (5-FU). BLM, ADM, CQ, VBL and 5-FU exhibited a lower lethal effect on the plateau phase cells than on the exponential phase cells. MMC, CDDP and ACNU showed almost the same effect on cells in both phases. None of the anticancer drugs exerted a dominant cell killing effect on the plateau phase cells. Chemosensitivity tests using plateau phase cells may be useful for selection of more effective drugs for clinical use.

要旨: 培養癌細胞の plateau phase culture を, *in vivo* における癌組織の1つのモデルとして採用した。すなわちヒト腎癌由来培養細胞 KN-41の plateau phase culture を設定し, その核 DNA 量の測定および各種抗癌剤の殺細胞効果の検討を行い, exponential phase culture におけるそれらの結果と比較した。DNA 分析は顕微蛍光測定法にて行い, ヌードマウスにおける KN-41移植腫瘍, および臨床材料からの腎癌組織とともに検討した。 $G_1 + G_0$ ($G_{1/0}$) 分画, S 分画の割合においては, plateau phase culture が exponential phase culture に比べ, 腎癌の *in vivo* のものと比較的近い値を示した。抗癌剤感受性はコロニー形成法にて求めた。BLM, ADM, CQ, VBL および 5-FU では plateau phase 細胞が exponential phase 細胞に比し低感受性を示し, MMC, CDDP および ACNU では両 phase 間に感受性の差は認められなかった。以上, DNA distribution から考えると KN-41細胞において, exponential phase culture に比し plateau phase culture がより *in vivo* のヒト腎癌に近く, この plateau phase 細胞がいくつかの抗癌剤において exponential phase 細胞と異なる感受性を示したことより, plateau phase において抗癌剤感受性試験を行うことは臨床面からみて意義のあるものと考えられた。

緒 言

腎癌は抗癌剤の効果が期待できないものの1つとして分類され¹⁾, 治療法としては手術療法が主体となり抗癌化学療法をはじめとする補助療法の現況は悲観的

なものである。しかし, 腎癌症例では初診時すでに20~30%程度の遠隔転移が認められ, 術後の転移出現も同程度に認められる^{2)~4)}ことより全身的抗癌化学療法の必要な症例が多く, 有効な化学療法の確立が急務

となっている。

当教室では樹立培養細胞株を用いて抗癌剤の感受性について基礎的実験^{9)~11)}、およびその臨床応用¹²⁾¹³⁾を重ねてきた。今回、著者は培養細胞の plateau phase culture を *in vivo* の癌組織モデルとする報告^{14)~17)}がある点に注目し、核 DNA 量測定にて培養細胞の plateau phase culture, exponential phase culture および *in vivo* の癌組織を比較し、また両 phase の細胞に対する各種抗癌剤の感受性につき比較、検討した。

実験材料および実験方法

1. 培養細胞および培養方法

当教室において1978年、30歳女性の clear cell type の左腎癌より分離、樹立され¹⁸⁾、現在も継代培養を行っているヒト腎癌由来培養細胞株 KN-41の、主に30代培養のものを使用した。継代培養には培養液として非働化した20% fetal calf serum (Lot. No. 95056, Microbiological Assoc., Md., U.S.A.)および kanamycin sulfate (明治製薬(株), 東京) 50 μ g/ml を含有した Ham F12培地 (白水製薬(株), 東京) を 7% NaHCO₃ (大塚製薬(株), 東京) により pH を 6.8 に調整 (以下, FC-20 と略す), 使用し 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95% air 培養器内にて閉鎖培養を行っている。

2. exponential phase culture および plateau phase culture の設定

本実験に用いる両 phase の細胞を設定するため、細胞増殖曲線を求め、さらに細胞の plating efficiency および培養液の pH の時間的推移についても合わせて測定した。

1) 細胞増殖曲線

tissue culture dish 3001, 35 $\times$ 10mm (Falcon, Cal., U.S.A.) に FC-20 2ml に対し KN-41細胞が10万個となるように植え込み、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95% air 下に静置培養を行った。この際、培養液の交換をまったく行わない群と2日目以後毎日培養液 (2ml) の交換を行う群の2群を設定した。植え込み後24時間毎に経時的に3枚ずつの dish を取り出し 0.02% EDTA 溶液 (和光純薬工業(株), 大阪) 1ml と 0.1% pronase 溶液 (75万単位/g, 科研化学(株), 東京) 1ml を加え pipetting により細胞を剥離、均一な単細胞浮遊液を作成後、これを血球計算板により倒立顕微鏡下で算定し、各 dish あたりの細胞数を求め、3枚の dish の平均値をその時期の細胞数とし細胞増殖曲線を求めた。

2) 細胞の plating efficiency および培養液の pH の測定

2日目以後毎日培養液交換を行う群においては、24時間毎に交換前に plating efficiency, および培養液の pH を測定した。plating efficiency は以下の要領にて求めた。各時期の dish に EDTA 1ml, pronase 1ml を加え単離、遠心後 FC-20 を加えて作成した単細胞浮遊液 (125個/ml) を同 type の culture dish に 2ml 分注し、5% CO₂-95% air 下に 37 $^{\circ}$ C で静置培養を行った。10日後培養液を捨て 10% formalin で固定、ギムザ染色を行い 50個以上の細胞からなるコロニーを肉眼的に数えた。さらに植え込んだ細胞数 (250個/dish) からコロニー形成率を算定し plating efficiency とした。

3. 核 DNA 量の検討

1) 顕微蛍光測定法による定量

両 phase の細胞の核 DNA 量、さらに *in vivo* の癌組織の核 DNA 量を比較するため、ヌードマウスにおける KN-41移植腫瘍、および臨床材料からの腎癌組織とともに顕微蛍光測定法にて測定した。

a) 細胞単離法

実験結果のところで述べるように2日目以後毎日培養液を交換した群の、植え込み後3日目および7日目の細胞をそれぞれ本実験における exponential phase, plateau phase の細胞と定義したが、この3日目、7日目の dish を取り出し EDTA 1ml, pronase 1ml で単離、遠心後 FC-20 を加えて単細胞浮遊液とした。

ヌードマウスにおける KN-41移植腫瘍は当教室の小泉⁹⁾の方法に準じて移植して得られたもので、移植後30日目約 1cm³ 程度になった腫瘍を生理食塩水内で鉄で細切、ステンレス mesh ですりつぶし、さらに 26G 注射針を通し FC-20 を加えて単細胞浮遊液とした。

臨床材料より得られた腎癌組織は、病理組織学的に腎癌と証明されている18症例からの腫瘍で、これも腫瘍の一部を細切後、mesh、注射針を通したあと FC-20 を加え単細胞浮遊液とした。

それぞれの浮遊液を生理食塩水で3回洗浄遠心後、100% methanol で30分固定し、塗抹標本を作成した。この際、培養細胞およびヌードマウスにおける KN-41 移植腫瘍から得られた細胞の標本にはヒト静脈血から得た白血球を同一スライドに塗抹した。

b) 染色法

藤田らの方法¹⁹⁾に準じて Feulgen 染色を行った。この際、Stowell の緩衝 Schiff 液にて10分間の Feulgen 反応のあと緩衝リンス液にて2分間ずつ3回洗浄した。Entellan (Merck, W. Germany) にて封入後、post-irradiation 法¹⁹⁾²⁰⁾にて非特異蛍光の除去、特異蛍光の

安定を行った。

c) 測定法

DNA Feulgen 蛍光定量は BH2-QRFL システム (オリンパス光学工業(株), 東京) を用いて測定した。これは落射蛍光顕微鏡 Model BH-2, コントロールボックス, 超高圧水銀灯, パーソナルコンピュータおよびプロッターから構成されている。蛍光には波長 545nm の励起光を用い, 測定する標本中のリンパ球 30 個の測光値の平均値を control 2C 値とし腫瘍細胞は各標本 300 個を測定し DNA histogram を作成した。なお両 phase の細胞ならびにヌードマウスの KN-41 移植腫瘍に対しては別の標本にて 3 回測定を繰り返し, その総和として 900 個の細胞より最終的に DNA histogram を作成した。

2) flow cytometry による定量との比較

両 phase の細胞については上記の顕微蛍光測光法による DNA histogram を, flowcytometry (以下, FCM と略す) による DNA histogram と比較した。これは EDTA 1ml, pronase 1ml で単離後, FC-20 で 1 回, 生理食塩水で 3 回洗浄した細胞を 96% ethanol に浮遊, 固定した状態で Sweden, Stockholm の Karolinska 研究所放射線生物学教室に送り, FCM による核 DNA 量の測定を依頼した。定量法は Tribukait らが詳細に述べている²¹⁾が, 両 phase の細胞とも 3 万個以上の細胞により DNA histogram が得られた。

3) データ解析法

DNA histogram 中の $G_{1/0}$ (G_1 および G_0), S, G_2M の各分画に存在する細胞の割合の解析は, 現在確立された方法がない²²⁾ことより, 単純に図形の面積を求める方法を用いることとし, FCM では Baisch ら²³⁾の方法により求め, また顕微蛍光測光法では他の報告^{24)~28)}による方法も参考にし, 以下のように求めた (Fig. 1)。すなわち modal value に相当するチャンネルおよび modal value の 2 倍の DNA 量に相当するチャンネルを縦に 2 等分する線を引き, 前者の 2 等分線より最低の DNA 量を示すチャンネルまでの幅を a とした場合, 前者の 2 等分線より左側の面積の 2 倍したものの全体の面積に対する割合を $G_{1/0}$ 分画とし, 後者の 2 等分線より右側へ $2a$ までの幅の間の面積の 2 倍したものの割合を G_2M 分画, さらに臨床材料の腎癌組織では G_2M 分画を越える DNA 量を示す細胞があり, その面積の割合を polyploid 細胞の割合 (P) とし, 最後に全体からこれらの割合を差し引いたものを S 分画とした。

Fig. 1 Schematic representation of determination of percentages of cells in $G_{1/0}$, S and G_2M fractions and polyploid cells (P) on the DNA histogram obtained by static cytofluorometry.

4. 抗癌剤感受性

1) 使用薬剤

現在腎癌に対する有効な薬剤は見い出されていないので, 比較的作用機序の異なる薬剤を 8 種選んだ。アルキル化剤としては carbazylquinone (CQ, 三共(株), 東京), 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU, 三共(株)), cis-diamminedichloroplatinum (CDDP, Bristol-Myers, Co., U.S.A.), 代謝拮抗剤としては 5-fluorouracil (5-FU, 協和醗酵工業(株), 東京), 抗癌性抗生物質としては bleomycin (BLM, 日本化薬(株), 東京), adriamycin (ADM, 協和醗酵工業(株)), mitomycin C (MMC, 協和醗酵工業(株)), 植物性抗癌剤としては vinblastine (VBL, 塩野義製薬(株), 大阪) を用いた。

2) 投与方法および感受性の測定

各薬剤を使用直前 Ham F12 にて希釈した。両 phase の細胞の存在する dish に, 各種濃度に希釈した薬剤を 50~100 μ l, 最終的に目的濃度となるように投与した。薬剤は 2 時間あるいは 24 時間作用させ, その後培養液を捨て Ham F12 にて 2 回洗浄, EDTA 1ml, pronase 1ml で細胞単離後遠心し, 125 個/ml になるよう FC-20 で溶解し, この細胞浮遊液を 2ml, 同 type の dish に 3 枚ずつ植え込み 5% CO_2 -95% air 下に 37°C, 10 日間の静置培養を行った。その後培養液を捨て, 10% formalin で固定, ギムザ染色後 3 枚の dish のコロニー数を求め, その平均値より plating efficiency を算出し, 薬剤接触を行わなかった dish (control) の plating efficiency に対する各濃度における plating efficiency の割合を survival fraction とし, 各薬剤につき両 phase の細胞とも 3 回実験を繰り返し, 平均値および

標準偏差を算出し dose-survival curve を求めた。なお 24 時間作用させた薬剤は 5-FU および VBL でこれらは 2 時間作用させた場合において KN-41 細胞に対して殺細胞効果は高濃度でもほとんど認められなかったため、他の薬剤はすべて 2 時間の接触時間で上記の実験を行った。

実験結果

1. exponential phase culture および plateau phase culture の設定

1) 細胞増殖曲線

Fig. 2a に示すように植え込み後 1 日の lag phase をおいて exponential phase に入った。培養液交換を行わない群では 4 日目に細胞数は最大となったが plateau phase は作らず、細胞は死滅し細胞数は減少した。一方、2 日目以後毎日培養液交換を行った群では 6 日目に約 270 万個の細胞数となり plateau phase に達し、9 日目以後は減少した。

2) plating efficiency および pH の推移

Fig. 2b に示すように plating efficiency は 8 日目までは 80% 前後を維持していたが、9 日目には 10% 以下に著しく低下した。pH は Fig. 2c に示すとおりで 3 日目までは 6.8、4 日目より次第に低下し 8 日目には 6.1、9 日目には 5.9 となった。

以上の結果より、2 日目以後毎日培養液交換を行い、exponential phase のほぼ中間点となる 3 日目の細胞、および plateau phase の中で安定した plating efficiency が得られ、pH の変動による薬剤の殺細胞効果への影響が少ないと思われる 7 日目の細胞を、それぞれ本実験に用いる exponential および plateau phase culture と設定した。

2. 核 DNA 量測定

1) 両 phase の細胞

顕微蛍光測光法、および FCM により求められた両 phase の細胞の DNA histogram を Fig. 3 に示す。両測定法による DNA histogram の modal value はいずれも 2.8C に一致した。G_{1/0}, S および G₂M の各分画に存在する細胞の割合は exponential phase culture においては、顕微蛍光測光法による測定ではそれぞれ 52.8%, 41.1%, 6.1% で、FCM による測定では 50.1%, 35.6%, 14.4%、また plateau phase culture においては、前者では 68.4%, 28.8%, 2.8% で、後者では 65.9%, 29.4%, 4.7% で、両者による測定値は両 phase とともに比較的近い値を示した。

2) ヌードマウスにおける KN-41 移植腫瘍

Fig. 2 Changes in (a) number of cells/dish, (b) plating efficiency and (c) pH with age of cultures following inoculation of 10^5 cells at Day 0. Open circles: unfed cultures (medium left unchanged). Solid circles: cultures with daily medium change starting on Day 2.

Fig. 3 DNA histograms and percentages of cells in G_{1/0}, S and G₂M fractions obtained from exponential phase cultures (left), and plateau phase cultures (right). Top: obtained by flow cytometry. Bottom: obtained by static cytofluorometry.

Fig. 4 The DNA histogram and percentages of cells in $G_{1/0}$, S and G_2M fractions obtained from KN-41 cell tumors heterotransplanted in nude mice.

Table 1 Percentages of cells in $G_{1/0}$, S and G_2M fractions and polyploid cells obtained from surgical specimens of renal cell carcinoma.

Case number	%			
	$G_{1/0}$	S	G_2M	Polyploid
1	61.1	23.3	14.3	1.3
2	75.9	20.8	3.3	0.0
3	70.2	16.8	13.0	0.0
4	62.9	24.0	11.4	1.7
5	72.9	21.0	5.4	0.7
6	57.5	7.4	30.8	4.3
7	81.6	11.8	6.3	0.3
8	80.6	16.7	2.7	0.0
9	71.9	16.8	11.0	0.3
10	89.3	3.0	7.4	0.3
11	69.9	19.1	10.7	0.3
12	66.2	23.7	8.4	1.7
13	91.0	4.4	4.6	0.0
14	86.3	13.0	0.7	0.0
15	60.8	12.1	15.1	12.0
16	75.2	14.5	10.0	0.3
17	79.3	17.4	3.3	0.0
18	72.6	17.8	9.0	0.6
Range	57.5~91.0	2.0~24.0	0.7~30.8	0.0~12.0
Mean	73.6	15.8	9.3	1.3

顕微蛍光測光法により得られた histogram を Fig. 4 に示す。modal value は *in vitro* における両 phase culture のものと一致した。 $G_{1/0}$, S, G_2M の各分画に存在する細胞の割合はそれぞれ68.1%, 21.9%, 10.0%で、plateau phase culture に近い値を示し、その中でも $G_{1/0}$ 分画の割合はほぼ一致した。

Fig. 5 Distribution of surgical specimens of renal cell carcinoma according to percentages of cells in $G_{1/0}$, S and G_2M fractions. E: the percentage obtained from exponential phase culture. P: the percentage obtained from plateau phase cultures. N: the percentage obtained from KN-41 cell tumors heterotransplanted in nude mice.

3) 臨床材料より得られた腎癌組織

顕微蛍光測光法により核 DNA 量測定を行った各臨床材料の、DNA histogram より得られた $G_{1/0}$, S, G_2M 分画の細胞および polyploid 細胞の割合を Table 1 に示す。 $G_{1/0}$, S, G_2M 分画, polyploid 細胞の割合はそれぞれ57.5~91.0% (平均73.6%), 3.0~24.0% (15.8%), 0.7~30.8% (9.3%) および 0~12.0% (1.3%) で、また各分画の各割合における度数分布を Fig. 5 に示す。この図内に両 phase culture, ノードマウスの移植腫瘍の各分画の割合を図示すると、exponential phase culture に比し、plateau phase culture および移植腫瘍は $G_{1/0}$ 分画では臨床材料の平均的位置に相当し、S 分画においても臨床材料に比較的近い値を示した。

3. 抗癌剤感受性

KN-41細胞の exponential および plateau phase における各抗癌剤の dose-survival curve を Fig. 6, 7, 8 に示す。まず、薬剤接触時間が2時間の6剤のうち plateau phase 細胞が exponential phase 細胞に比し

Table 2 MTD, IC₉₀ and Therapeutic Index of each anticancer drug.

Drugs	MTD (mg/kg)	IC ₉₀ (μg/ml)		Therapeutic Index	
		Exponential phase	Plateau phase	Exponential phase	Plateau phase
CQ	0.3	0.035	0.069	8.6	4.3
ADM	2.0	0.54	2.4	3.7	0.83
MMC	1.0	0.37	0.37	2.7	2.7
CDDP	5.0	4.6	4.6	1.1	1.1
BLM	3.0	26	73	0.12	0.41
ACNU	4.0	48	48	0.083	0.083

Fig. 6 Dose-survival curves of KN-41 cells treated with BLM, ADM and CQ. Open circles: exponential phase cultures. Solid circles: plateau phase cultures.

Fig. 7 Dose-survival curves of KN-41 cells treated with MMC, CDDP and ACNU. Open circles: exponential phase cultures. Solid circles: plateau phase cultures.

Fig. 8 Dose-survival curves of KN-41 cells treated with VBL and 5-FU. Open circles: exponential phase cultures. Solid circles: plateau phase cultures.

認められなかった。薬剤接触時間が24時間の VBL および5-FU の2剤はともに plateau phase に感受性が低く認められた。

4. 90%Growth Inhibition Concentration (IC₉₀) および Therapeutic Index

薬剤接触時間が2時間の6剤で、得られた dose-survival curve より両 phase における各薬剤の IC₉₀ を求め、さらに臨床効果を推定する可能性があるという²⁹⁾ therapeutic index を、ヒト最大耐量 maximum tolerance dose (MTD) を IC₉₀ で除することより求めた (Table 2). therapeutic index が高いほど治療効果も高いと考えられる²⁹⁾が、この index の順位は exponential phase 細胞では CQ>ADM>MMC>CDDP>BLM>ACNU で、一方 plateau phase 細胞では CQ>MMC>CDDP>ADM>BLM>ACNU となり、ADM の順位が下がり、それに伴い MMC および CDDP の順位が上がった。

明らかに低感受性を示したものが BLM, ADM および CQ の3剤で、残りの MMC, CDDP および ACNU の3剤では両 phase の細胞間に感受性の差はほとんど

考 察

多くの固型癌が化学療法に効果の少ない原因として Hagemann ら³⁰⁾は、癌細胞固有の抵抗性、細胞動態の特性、低酸素低代謝状態にある細胞分画の存在、血流の不足などをあげている。またヒト癌の1つの特徴として、極めて長くばらつきの大きい G_1 あるいは G_0 期の細胞より成る非増殖分画が多くを占め、増殖期にある細胞が少ないことが知られており^{31)~33)}、このような *in vivo* の癌組織の1つのモデルとして、*in vitro* 培養系の plateau (あるいは stationary, non-cycling) phase culture の有用性が報告されている^{14)~17)}。つまり cell cycle が短かく、指数関数的に増殖している状態の exponential phase culture を用いたこれまでの多くの実験結果を、cell cycle の長い、ことに G_1 期が長く、また非増殖分画の多い *in vivo* 状態に対応させることは無理があるが、plateau phase culture を用いることにより、より *in vivo* に近い状態での研究が行われるようになってきた。今回、著者も現在有効な化学療法剤の見つかっていない腎癌に対し、何らかの手掛りを得るため plateau phase culture を用いた本実験を行った。

本実験のような抗癌剤の感受性の研究以外に plateau phase culture は熱感受性や放射線感受性の研究においても利用されている。まず熱感受性の点では、Bhuyan ら³⁴⁾は L1210細胞などで plateau phase 細胞が exponential phase 細胞に比し感受性が高いが、cell cycle の各時期による感受性の差の検討による結果、すなわち S 期において最も熱感受性が高かった事実と比較し、S 期の少ない plateau phase 細胞に高感受性を示したのは、この細胞は熱による損傷からの回復が悪いためではないかとし、age response のみでは説明できないと述べている。一方、放射線感受性の点では、Little³⁵⁾はヒト肝由来 LICH 細胞を用いた plateau phase culture において潜在的致死損傷からの回復現象が認められることを報告し、また Hahn ら¹⁴⁾はいくつかの報告を比較し、照射直後に tripsinization, plating を行うことを前提にすれば exponential phase 細胞に比し plateau phase 細胞が、dose-survival curve の外挿値の低下を示す type と、直線部分における Do 値の減少を示す type の2種類あるとし、その違いはそれぞれの細胞株における plateau phase culture の増殖動態の差によるものだろうと述べている。

抗癌剤に対する感受性に関しては、plateau phase 細胞が exponential phase 細胞に比しより高い感受性

を示したとの報告は BLM^{15)36)~39)} BCNU¹⁵⁾³⁰⁾³⁶⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾, CCNU⁴⁰⁾, Me-CCNU⁴⁰⁾, CDDP⁴²⁾, actinomycin-D⁴³⁾, vincristine³⁹⁾などの抗癌剤において認められる。しかし、同一薬剤でも報告により感受性は一定していない。使用する細胞株では齧歯類由来のものをを用いた研究が多く、ヒト由来のものでも浮遊細胞のものが主で¹⁷⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾、ヒト固型癌由来の細胞株を用いた研究は Drewinko ら⁴²⁾の報告を除くと見当たらない。実験に用いる plateau phase の条件設定に関しても細胞株同様各報告者により一定していない。細胞数、plateau phase に達してから用いるまでの時間、培養液の条件、plating efficiency、そして細胞動態や cell cycle の各時期における細胞の分布状態などにより条件が設定されている。

この中で plateau phase に達してから用いるまでの時間に関しては、24時間前後のものから10~14日間(用いる細胞の cell cycle time の1から28倍)とかなりの差がある。培養液内の pH の変動については Bhuyan ら⁴¹⁾が glucose、乳酸の濃度とともに検討し培養時間の延長に伴い glucose 濃度の低下、乳酸濃度の上昇そして pH の下降を認め、exponential phase では細胞植え込み時同様 pH は7.3であったが、plateau phase では6.3前後まで変動していることを示した。plating efficiency については両 phase 間で差のないもの³⁰⁾から、plateau phase が明らかに低値を示すもの¹⁶⁾⁴¹⁾までさまざまである。今回の著者の実験では、植え込み後培養液交換を行わない unfed culture で plateau phase が得られなかったため2日目以後毎日培養液を交換した。そして初日の pH は6.8で、日を増すごとに低下し、特に8日目以後の低下が著明であったこと、癌組織の pH は6.6~7.0であったとする報告⁴⁶⁾が認められること、さらに pH により放射線感受性、熱感受性が変わるように抗癌剤においても pH の変動により感受性が変化する可能性があることなどを考慮し、十分な plating efficiency が得られ、pH の変動が比較的少なかった植え込み後7日目の細胞を本実験の plateau phase culture と定義した。細胞動態の点では Hahn ら¹⁴⁾は、chinese hamster 卵巣由来 HA 細胞およびヒト肝由来 LICH 細胞の両 phase において培養液交換の有無で区別される fed culture と unfed culture での pulse label index (LI), mitotic index (MI) などいくつかの細胞動態のパラメーターに関して詳しく検討している。plateau phase における fed culture と unfed culture を比較し、fed culture で LI が高く、MI もや

や高く、また G_1 期に存在する細胞の割合は高い方から順に unfed late plateau phase, fed plateau phase, unfed early plateau phase culture であったと述べている。Mauro¹⁶⁾は数種の細胞株の報告されているデータより unfed late plateau phase culture の LI, MI はそれぞれ 0~47%, 0~1% の範囲で、plateau phase と言えども細胞回転を依然として続けている分画が存在することを強調している。他の多くの報告でも plateau phase culture の LI は 0~4% であるが、一方で 45%⁴¹⁾, 30%⁴⁵⁾ という高い LI の報告もある。

また、plateau phase の cell cycle の各分画の割合に関しては、Drewinko ら⁴²⁾は S 期, G_2 期の分画がそれぞれ 15%, 16%, Krishan ら⁴⁵⁾は G_1 期, S 期, G_2 M 期の各分画が 64%, 17%, 14%, また Bhuyan ら⁴¹⁾もそれぞれの各分画が 42.5%, 45.6%, 11.9% と S 期の分画が比較的高い報告や、isoleucin 欠乏培養液により G_1 期に細胞を蓄積することにより 90% 以上が G_1 期の分画を占めるという報告⁴⁰⁾もある。一方、*in vivo* のヒト固型癌の臨床材料から $G_{1/0}$, S, G_2 M 期の各分画の割合を求めた報告によると Barlogie ら⁴⁷⁾は FCM を用い悪性黒色腫、乳癌、肺癌などの症例よりそれぞれの各分画は 53~97% (平均 80%), 2~32% (14%), 1~15% (6%) であったとし、Olszewski ら⁴⁸⁾は FCM で乳癌 90 症例を検討し各分画はそれぞれ $83.2 \pm 8.6\%$, $9.1 \pm 5.8\%$, $8.0 \pm 6.0\%$ で、良性疾患の control 群の $G_{1/0}$ 期が $96.2 \pm 1.5\%$ という結果と比較し明らかに S, G_2 M 期が多いと述べている。鈴木ら²⁸⁾は脳腫瘍症例で顕微蛍光測定法を用い良性 glioma では $G_{1/0}$, S, G_2 M 期の分画がそれぞれ 65~86%, 5~33%, 2~12% で、また glioblastoma ではそれぞれ 22~60%, 15~47%, 6~28% と明らかにパターンの異なることを示した。泌尿器科領域でも Tribukait ら⁴⁹⁾が膀胱腫瘍を FCM で検討し各分画は 60.7~97.3%, 1.5~29.2%, 0.4~19.2% とし、腎癌では Schwabe ら⁵⁰⁾が FCM で検討し euploid DNA パターンを示すものでは S 期の分画は $5.2 \pm 1.2\%$ と少ないのに比し、aneuploid DNA パターンを示すものでは $14.4 \pm 15.9\%$ であったとする報告などが散見される。今回著者は、各分画の割合を顕微蛍光測定法による核 DNA 量測定より検討した。現在 FCM でも顕微蛍光測定法でも各分画の割合を正確に示す確立された方法はなく、報告によりさまざまな方法がとられている²²⁾²⁷⁾²⁸⁾。その中で Baisch ら²³⁾の方法は FCM から得られた histogram から単純に面積を求め各分画の割合を近似させている。これに似た、

単純な面積を求める方法は河本ら²⁴⁾、野村ら²⁵⁾、松浦ら²⁶⁾が FCM で、渡辺²⁷⁾が顕微蛍光測定法で示しており各分画あるいは $G_{1/0}$ 期, S+ G_2 M 期の分画を算定している。著者もこれらを参考にし、また G_2 M 期は $G_{1/0}$ 期の 2 倍の DNA 量で $G_{1/0}$ 期, G_2 M 期において変動係数は一定でそれぞれの分布がガウス分布を示すものと仮定し、まず $G_{1/0}$ 期と G_2 M 期の面積を求め、さらに渡辺²⁷⁾、鈴木ら²⁸⁾同様に DNA 量が G_2 M 期のものより大きい細胞を polyploid 細胞としそれに相当する面積を求め、最後に全体の面積からこれらの面積を差し引いたものを S 期の面積と想定して各分画の割合を求めた。この方法により求めた両 phase culture の各画の割合を、FCM から得られた histogram を Baisch ら²³⁾の方法に準じて解析した割合と比較すると、Fig. 3 に示したように比較的近い値を示したのでこの方法は各分画の割合をある程度は推定しうるものと考えられた。そして実験結果で述べたように各分画の割合に注目すると、今回の腎癌の臨床材料からの結果では、ヌードマウスにおける KN-41 移植腫瘍同様に、本実験の plateau phase culture における各分画の割合と類似した値を示し、これらの割合に関する限りヒト腎癌組織の *in vivo* のモデルの 1 つとしてこの plateau phase culture を用いることが確認された。また著者は今回検討はしなかったが、plateau phase は exponential phase に比し、cell cycle time も各期に要する時間もともに長く、特に G_1 期の時間は plateau phase で著明に延長し標準偏差も増加する傾向にある¹⁴⁾¹⁶⁾。すなわちヒト癌の特徴として G_1 期が長くばらつきの大きい cell cycle time をもつとされている³³⁾が、これが plateau phase culture にも認められるということである。

次に両 phase の細胞に対する各種抗癌剤の殺細胞効果につき考察する。まず BLM については、本実験の結果同様に plateau phase 細胞の方に殺細胞効果が低かったとの報告がいくつかみられ^{17)42)51)~53)}、その中で宮本ら¹⁷⁾はパーキット腫由来 P_3 HR-1 細胞を用い BLM に対し著しい抵抗性を示した plateau phase 細胞が、BLM に低い感受性を示す G_1 細胞より成ることを明らかにし、exponential phase 細胞の 4 倍近くも BLM を取り込む事実と比較し、plateau phase 細胞においては BLM に対する膜の透過性が高まるか、代謝の低下により細胞からの排泄が低下することにより BLM が蓄積はするけれども、その BLM は DNA 以外の高分子物質と結合しているか、あるいは BLM 不

活化酵素やアスコルビン酸などの低分子不活化物質の活性が高まっているため感受性は低いのではないかと推測している。また plateau phase の低感受性を、1) BLM に低い age response を示す G_1 細胞が多いため、2) BLM の膜透過性が低くなるか BLM の不活化能が高くなるため、3) BLM による損傷からの回復能が高いためなどによると推測している報告⁵¹⁾もある。一方、plateau phase 細胞のより高い殺細胞効果を示した報告も多く^{15)36)~39)}、この事実は臨床で進行したリンパ腫、睾丸腫瘍、扁平上皮癌などに対し BLM がしばしば著明な縮小効果を示すことと深く関係している¹⁷⁾のかも知れない。Barranco ら¹⁵⁾は CHO 細胞を用い、plateau phase 細胞は主に G_1 細胞から成るが exponential phase の G_1 細胞より高い感受性を認めることより、age response のみでは説明がつかず、BLM による損傷からの回復能が plateau phase で低下するのではないかと述べている。Twentyman ら³⁸⁾は EMT 6細胞を用い、plateau phase でも時期により BLM の感受性の点で差があり early plateau phase では exponential phase より低い感受性であったが、late plateau phase では逆に高い感受性を認めたとし、EMT 移植腫瘍の BLM 投与後30分の成績で slowly proliferating 細胞に感受性が高かったことと一致し、さらに BLM 投与後2時間以上経過すると slowly proliferating 細胞の感受性が低下し、これは潜在的致死損傷からの回復現象が作用しはじめるためと述べ、もしこの損傷からの回復を阻止する方法が確立したら BLM の slowly proliferating 細胞に対する優先的殺細胞効果が大いに利用されるだろうとまとめている。著者の成績では Twentyman ら³⁸⁾のいう late plateau phase ではなかったためか plateau phase 細胞の感受性は低かった。この点に関して、ヒト単層培養の plateau phase の維持期間が、本実験の KN-41細胞は3日間、Mauro ら¹⁶⁾の HeLa S_3 細胞は3~4日間、Drewinko ら⁴¹⁾の LoVo 細胞は4日間と短いために、late plateau phase の作成は容易でないと考えられた。次に ADM であるが、これまでの報告⁴¹⁾⁴²⁾⁴⁵⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾では著者の結果同様いずれも exponential phase 細胞に感受性が高く、この理由として S 期に ADM が最も感受性が高いこと⁴⁵⁾⁵⁶⁾、細胞増殖の盛んな状態で ADM の膜透過性が高いこと⁵⁴⁾などが考えられる。

アルキル化剤およびそれに類似する生物薬理学的作用を示すものとして CQ, MMC, CDDP および ACNU を著者は用いたが、これらの薬剤の dose-response

curve は宮本⁵⁷⁾が示すように X 線に類似した threshold-exponential type を示し、その shoulder は亜致死損傷からの回復によるものと考えられる。著者の結果ではこの4剤で CQ のみが exponential phase 細胞に感受性が高かった以外は両 phase の細胞間に感受性の差は認められなかった。CDDP に関しては Drewinko ら⁴²⁾は plateau phase 細胞に感受性が高く、dose-survival curve での shoulder が消失したとし、これは亜致死損傷からの回復能が低下したのかも知れないと述べている。MMC, CQ については宮本³³⁾はこの2剤の age response が G_1 期に比較的高い感受性を示すことより plateau phase 細胞に感受性が高いか、両 phase の細胞間に差はないかのいずれかであるとし、Drewinko ら⁴²⁾の結果同様、本実験でも MMC に関しては両 phase の細胞間に差は認められなかったが、CQ においては exponential plateau phase 細胞に感受性が高く認められた。これは CQ の最も安定な pH は7.5で、それより変化するほど分解速度が速くなる本剤の性質のため、plateau phase での pH の低下により実際投与した濃度よりも低濃度で作用した可能性も考えられる。nitrosourea 系薬剤については BCNU の報告が多い。Barranco ら¹⁵⁾は plateau phase 細胞に高い感受性を示すとともに shoulder が小さくなっており亜致死損傷よりの回復能の低下を示すものだろうとしている。Hahn ら¹⁴⁾も同様の結果を報告し、血清の有無、種類などで感受性に差が認められたことより、plateau phase で血清濃度が低下しそれに伴い血清蛋白と結合する BCNU が減少し、殺細胞効果をもつ遊離の BCNU が相対的に exponential phase よりも増加することにより plateau phase 細胞で高い感受性が認められたのであろうと推測している。Bhuyan ら⁴¹⁾もこの説を支持し血清濃度が低いほど殺細胞効果が高いとしている。Hagemann ら³⁰⁾は *in vitro*, *in vivo* でいずれも plateau phase で感受性が高く shoulder の減少が認められたと報告している。一方、Twentyman⁵⁵⁾は BCNU, CCNU で両 phase の細胞間に感受性の差はほとんどなく、*in vivo* の成績とも良く相関したと述べている。このほかにも nitrosourea 系薬剤を用いた報告は多い^{40)~43)51)58)}が成績は一定せず、また ACNU を用いたものは見当たらず、著者の成績では両 phase の細胞間に感受性の差はなかった。

次に VBL, 5-FU であるが、この両薬剤は本実験に用いた KN-41細胞に対しては比較的耐性が高かったためか2時間の接触時間では殺細胞効果が認められな

かったため、24時間で薬剤処理を行った。このうち VBL は vincristine 同様に分裂阻害剤であり分裂中期で染色体を両極で分ける紡錘体線維の基本構成単位である tubulin の合成、重合が主に S 期にかけて行われ、これらの薬剤がこの過程を阻害するため⁵⁷⁾ age response で S 期に最も感受性が高く、plateau phase では S 期の分画が少なく、また cell cycle time が長いので S 期に流入してくる細胞数も少ないために plateau phase 細胞に感受性が低かったのかも知れない。Drewinko ら⁴²⁾はわずか1時間の接触時間で両 phase の細胞に殺細胞効果は認められたが、その差はなかったとしている。vincristine では plateau phase 細胞により高い感受性を認めた報告³⁹⁾⁴⁷⁾や、逆の結果を認めた報告⁴¹⁾⁴²⁾もある。5-FU に関しては代謝拮抗剤で S 期の細胞が多いほど、さらに S 期に流入してくる細胞が多いほど殺細胞効果が高く、そのため plateau phase では低感受性と考えられ、他の報告³⁷⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁵⁹⁾同様の結果も著者も認めた。

以上、KN-41細胞の plateau phase および exponential phase culture の核 DNA 量を測定し各分画の割合を検討したところ、前者が *in vivo* の腎癌に類似した値を示した点、さらに8種抗癌剤を用いて両 phase の細胞の感受性を比較したところ、plateau phase 細胞に高い感受性を示す薬剤は使用したものから見い出せなかったが、感受性に差のある薬剤が認められ、therapeutic index の順位にも両 phase の細胞間で差を認めた点より、plateau phase 細胞を用いた抗癌剤感受性試験は意義のあるものと考えられた。すなわち最近盛んに行われるようになった stem cell assay を含め、*in vivo* の1つのモデルとされる plateau phase culture で検討されれば、さらに有効な癌の化学療法を確立する1つの手掛りを得る可能性があると考えられた。

結 語

ヒト腎癌由来培養細胞 KN-41を用い、exponential phase culture および plateau phase culture を設定し、核 DNA 量を臨床材料などとともに比較、検討し、また8種抗癌剤を両 phase の細胞に作用させ、その殺細胞効果を求めて検討を加えた。

1) 核 DNA 量測定では、plateau phase culture がヌードマウスにおける KN-41移植腫瘍および臨床材料より得られた腎癌組織、すなわち *in vivo* の状態と、G_{1/0} 分画および S 分画の割合が比較的近い値を示した。

2) 薬剤接触時間が2時間の6種抗癌剤で、plateau phase 細胞が exponential phase 細胞に比し低感受性を示したものは BLM, ADM および CQ の3剤で、両 phase の細胞間で感受性に差のなかったものは MMC, CDDP および ACNU の3剤であった。薬剤接触時間が24時間の VBL および 5-FU の2剤はともに plateau phase 細胞に感受性は低かった。

3) 薬剤接触時間が2時間の6剤から得られた dose-survival curve より IC₉₀ を求め、さらに therapeutic index を算出した。therapeutic index の順位は、exponential phase 細胞では CQ > ADM > MMC > CDDP > BLM > ACNU で、plateau phase 細胞では CQ > MMC > CDDP > ADM > BLM > ACNU となり、順位の変動を認めた。以上より臨床上是 *in vivo* の状態に近い plateau phase culture の殺細胞効果を検討した上で応用すべきであると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師久住治男教授に深く感謝の意を表します。また本研究に御協力頂いた先輩諸兄、教室員各位、田中耕一文部技官に感謝します。さらに核 DNA 量測定で御助言を頂いた福井医科大学病理学教室福田優教授ならびに、御協力を頂いた Stockholm, Karolinska 研究所放射線生物学教室 Bernhard Tribukait 教授に深謝します。

なお本論文の要旨は第21回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) DeVita, V.T. Jr., Young, R.C. and Canellos, G. P.: Combination versus single agent chemotherapy: A review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer*, 35, 98—110, 1975.
- 2) McDonald, M.W.: Current therapy for renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 127, 211—217, 1982.
- 3) 内藤克輔, 越田 潔, 西野昭夫, 西東康夫, 中嶋和喜, 三崎俊光, 久住治男, 黒田恭一: 当教室における過去18年間の腎細胞癌の臨床的検討。泌尿紀要, 28, 129—142, 1982.
- 4) 里見佳昭, 高井修道, 中橋 満, 古畑哲彦: 腎細胞癌の化学療法: 第1報。MFC 療法。日泌尿会誌, 73, 1422—1430, 1982.
- 5) 久住治男, 打林忠雄, 黒田恭一: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47を用いた抗癌剤感受性試験について。癌と化学療法, 6, 1057—1062, 1979.
- 6) 久住治男, 中嶋和喜, 黒田恭一: ACNU のヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW-103, RT4 に対する *in vitro* の殺細胞効果。西日泌尿, 43, 873—875, 1981.

- 7) 久住治男, 中嶋和喜, 黒田恭一: VP-16のヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW-103, RT4およびヒト腎癌由来培養細胞 KN-41に対する *in vitro* の殺細胞効果. 泌尿紀要, 27, 771—774, 1981.
- 8) Hisazumi, H., Nakajima, K. and Uchibayashi, T.: Chemosensitivity of established human bladder carcinoma cell lines *in vitro*. Gann, 74, 176—182, 1983.
- 9) 小泉久志: ヌードマウスにおける膀胱癌由来培養細胞 KK-47および腎癌由来培養細胞 KN-41移植腫瘍の抗癌剤感受性の検討. 日泌尿会誌, 74, 704—718, 1983.
- 10) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103, HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌, 74, 1606—1620, 1983.
- 11) 久住治男: 癌化学療法におけるヒト膀胱癌由来細胞株の応用. 組織培養, 10, 23—25, 1984.
- 12) Hisazumi, H., Uchibayashi, T., Katoh, M., Kobayashi, T., Nakajima, K., Naitoh, K., Misaki, T. and Kuroda, K.: Anticancer drug sensitivity *in vitro* in the bladder cancer cell line, KK-47 and prophylactic use of carbazilquinone and urokinase in bladder cancer. Urol. Res., 9, 231—235, 1981.
- 13) 打林忠雄, 久住治男, 西東康夫, 内藤克輔, 三崎俊光, 南後千秋, 田尻伸也, 中村武夫, 小島 明, 美川郁夫: 膀胱腫瘍に対する FAQ 療法. 泌尿紀要, 29, 1617—1623, 1983.
- 14) Hahn, G.M. and Little, J.B.: Plateau-phase cultures of mammalian cells: An *in vitro* model for human cancer. Curr. Top. Radiat. Res., 8, 39—83, 1972.
- 15) Barranco, S.C., Novak, J.K. and Humphrey, R. M.: Response of mammalian cells following treatment with bleomycin and 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea during plateau phase. Cancer Res., 33, 691—694, 1973.
- 16) Mauro, F., Falpo, B., Briganti, G., Elli, R. and Zupi, G.: Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells: I. Description of the plateau-phase system. J. Natl. Cancer Inst., 52, 705—713, 1974.
- 17) 宮本忠昭, 寺島東洋三: 静止期 Burkitt lymphoma 細胞に対するプレオマイシンの細胞致死効果. 癌と化学療法, 9, 652—659, 1982.
- 18) 内藤克輔, 久住治男, 鹿子木基二, 加藤正博, 中嶋和喜, 塚原健治, 小林徹治, 黒田恭一, 松原藤継: ヒト腎癌および膀胱癌由来培養細胞株 KH-39, KN-41および KW-103の樹立とその性状. 日泌尿会誌, 73, 1019—1031, 1982.
- 19) 藤田哲也, 福田 優: DNA. 新組織化学, p. 469—500, 朝倉書店, 東京, 1975.
- 20) Fukuda, M., Nakanishi, K., Sawamura, I. and Fujita, S.: Standardization of the post-irradiation method to elimination primary fluorescence in cytofluorometry. Histochemistry, 52, 119—127, 1977.
- 21) Tribukait, B., Moberger, G. and Zetterberg, A.: Methodological aspects of rapid-flow cytofluorometry for DNA analysis of human urinary bladder cells. In First International Symposium on Pulse Cytophotometry, p. 50—60, European Press, Ghent, Belgium, 1975.
- 22) 渡部郁雄: データ解析法: 概論. フローサイトメトリー・手技と実際, p. 515—528, 蟹書房, 東京, 1984.
- 23) Baisch, H., Göhde, W. and Linden, W.A.: Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. Rad. and Environm. Biophys., 12, 31—39, 1975.
- 24) 河本圭司, 松村 浩: Flow cytometry (FCM) による脳腫瘍の悪性度の評価. 癌の臨床, 27, 1516—1522, 1981.
- 25) 野村和弘, 山本博昭, 渋井壮一郎, 三木啓全, 関 政子: 脳腫瘍の化学療法に対する flow cytometry 分析の応用: 第1報. 各種抗癌剤による細胞動態の変化. 脳と神経, 33, 341—350, 1980.
- 26) 松浦 健, 辻橋宏典, 神田英憲, 秋山隆弘, 栗田孝: 尿路悪性腫瘍における flow cytometry の応用: 第3報. DNA ヒストグラム定量化による膀胱腫瘍剝離細胞診の試みおよび治療効果判定, 経過観察への応用. 日泌尿会誌, 76, 89—95, 1985.
- 27) 渡辺是久: 多形性腺腫の腫瘍細胞核 DNA 定量による診断的研究: 特に組織パターンおよび臨床悪性度と核 DNA 量との相関について. 歯基礎誌, 24, 466—495, 1982.
- 28) 鈴木憲三, 平山公義, 上田 聖, 中西和夫, 木村浩彦, 福田 優: 顕微蛍光測定法による脳腫瘍細胞の DNA 定量. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), 23, 95—102, 1983.
- 29) 下山正徳: 培養株の薬剤感受性度測定とその臨床的意義. 組織培養, 6, 142—147, 1980.
- 30) Hagemann, R.F., Schenken, L.L. and Leshner, S.: Tumor chemotherapy: Efficacy dependent on mode of growth. J. Natl. Cancer Inst., 50, 467—474, 1973.
- 31) Mendelsohn, M.L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse: III. The growth fraction. J. Natl. Cancer Inst., 28, 1015—1029, 1962.
- 32) 土屋 純, 前川 正: 細胞回転と化学療法. 癌と化学療法, 5, 717—726, 1978.
- 33) 宮本忠昭: 細胞周期と癌治療. 組織培養, 6, 175—182, 1980.

- 34) Bhuyan, B.K., Day, K.J., Edgerton, C.E. and Ogunbase, O.: Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia. *Cancer Res.*, **37**, 3780—3784, 1977.
- 35) Little, J.B.: Factors influencing the repair of potentially lethal radiation damage in X-irradiated human cells. *Radiat. Res.*, **56**, 320—333, 1973.
- 36) Hahn, G.M., Gordon, L.F. and Kurkjian, S.D.: Responses of cycling and noncycling cells to 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and to bleomycin. *Cancer Res.*, **34**, 2373—2377, 1974.
- 37) Ray, G.R., Hahn, G.M., Bagshaw, M.A. and Kurkjian, S.: Cell survival and repair of plateau-phase cultures after chemotherapy: Relevance to tumor therapy and to the in vitro screening of new agents. *Cancer Chemother. Rep.*, **57**, 473—475, 1973.
- 38) Twentyman, P.R. and Bleehen, N.M.: Changes in sensitivity to radiation and to bleomycin occurring during the life history of monolayer cultures of a mouse tumour cell line. *Br. J. Cancer*, **31**, 68—74, 1975.
- 39) Olah, E., Palyi, I. and Sugar, J.: Effects of cytostatics of proliferating and stationary cultures of mammalian cells. *Europ. J. Cancer*, **14**, 895—900, 1978.
- 40) Tobey, R.A. and Crissman, H.A.: Comparative effect of three nitrosourea derivatives on mammalian cell cycle progression. *Cancer Res.*, **35**, 460—470, 1975.
- 41) Bhuyan, B.K., Fraser, T.J. and Day, K.J.: Cell proliferation kinetics and drug sensitivity of exponential and stationary population of cultured L1210 cells. *Cancer Res.*, **37**, 1057—1063, 1977.
- 42) Drewinko, B., Patchen, M., Yang, L.Y. and Barlogie, B.: Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Res.*, **41**, 2328—2333, 1981.
- 43) Thatcher, C.J. and Walker, I.G.: Sensitivity of confluent and cycling embryonic hamster cells to sulfur mustard, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and actinomycin D. *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 363—368, 1969.
- 44) Rosner, F., Hirshaut, Y., Grünwald, H.W. and Dietrich, M.: *In vitro* combination chemotherapy demonstrating proliferation of vincristine cytotoxicity by prednisolone. *Cancer Res.*, **35**, 700—705, 1975.
- 45) Krishan, A. and Frei, E. III.: Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblast. *Cancer Res.*, **36**, 143—150, 1976.
- 46) Ashby, B.S.: pH studies in human malignant tumours. *Lancet*, **2**, 312—315, 1966.
- 47) Barlogie, B., Göhde, W., Johnston, D.A., Smal-wood, L., Schumann, J., Drewinko, B. and Freireich, E.: Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res.*, **38**, 3333—3339, 1978.
- 48) Olszewski, W., Darzynkiewicz, Z., Rosen, P.P., Schwartz, M.K. and Melamed M.R.: Flow cytometry of breast carcinoma: II. Relation of tumor cell cycle distribution to histology and estrogen receptor. *Cancer*, **48**, 985—988, 1981.
- 49) Tribukait, B., Gustafson, H. and Esposti, P.: Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow-cytofluorometric DNA-analysis and its relations to histopathology and cytology, *Cancer*, **43**, 1742—1751, 1979.
- 50) Schwabe, H.W., Adolphs, H.D. and Vogel, J.: Flow-cytophotometric studies in renal carcinoma. *Urol. Res.*, **11**, 121—125, 1983.
- 51) Twentyman, P.R. and Bleehen, N.M.: The sensitivity of cells in exponential and stationary phases of growth to bleomycin and to 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Br. J. Cancer*, **28**, 500—507, 1973.
- 52) Mauro, F., Falpo, B., Briganti, G., Elli, R. and Zupi, G.: Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells: II. Bleomycin and hydroxyurea. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 715—722, 1974.
- 53) Epifanova, O.I., Smolenskaya, I.N. and Polunovsky, V.A.: Responses of proliferating and non-proliferating chinese hamster cells to cytotoxic agents. *Br. J. Cancer*, **37**, 377—385, 1978.
- 54) Barranco, S.C. and Novak, J.K.: Survival responses of dividing and nondividing mammalian cells after treatment with hydroxyurea, arabinosylcytosine, or adriamycin. *Cancer Res.*, **34**, 1616—1618, 1974.
- 55) Twentyman, P.R.: Comparative chemosensitivity of exponential- versus plateau-phase cells in both in vitro and in vivo model systems. *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 1717—1722, 1976.
- 56) Kim, S. and Kim, J.H.: Lethal effect of adriamycin on the division cycle of HeLa cells. *Cancer Res.*, **32**, 323—325, 1972.

- 57) 宮本忠昭：組織培養と化学療法。組織培養, 10, 15—18, 1984.
- 58) Tobey, R.A., Oka, M.S. and Crissman, H.A. : Differential effects of two chemotherapeutic agents, Streptozotocin and chlorozotocin, on the mammalian cell cycle. *Europ. J. Cancer*, 11, 433—441, 1975.
- 59) Modoc-Jones, H. and Bruce, W.R. : Sensitivity of L cells in exponential and stationary phase to 5-fluorouracil. *Nature*, 215, 302—303, 1967.
(1985年1月28日受付)
-